

## RETENTISSEMENT D'UNE ACIDIFICATION DU MILIEU SUR LA GLYCOSYLATION MEMBRANAIRE DE CELLULES EPITHELIALES DE TRACHEE EN CULTURE

F. Rogerieux, G. Lacroix, D. Oberson-Geneste, J-M. Porcher, et C. Lambré.  
INERIS, Département de Toxicologie et Ecotoxicologie, B.P.2, 60550 Verneuil en Halatte.

### 1- INTRODUCTION

Les pluies acides représentent une des formes les plus graves de la pollution atmosphérique. Elles sont générées essentiellement par solubilisation dans l'eau de deux gaz polluants: le SO<sub>2</sub> qui peut se transformer en acide sulfurique et le dioxyde d'azote qui peut générer de l'acide nitrique. Ces acides confèrent alors aux précipitations un pH moyen de 3,6 pouvant aller jusqu'à 2 et, de ce fait, contribuent à abaisser le pH de nombreux milieux biologiques. Ceux ci comprennent des écosystèmes entiers (lacs) mais également certains tissus humains comme les voies respiratoires. Des études ont montré que l'abaissement du pH pouvait jouer un rôle significatif dans l'altération de certaines fonctions essentielles pour de nombreuses cellules, en particulier, les cellules épithéliales. Certaines de ces fonctions sont associées à l'expression membranaire de structures complexes dans lesquelles la partie glucidique est primordiale (1) et, dans ce cas, les acides sialiques sont incriminés (2). Cette étude a donc eu pour but de rechercher les conséquences d'un abaissement du pH local sur la sialylation des glycoconjugués membranaires en prenant comme modèle d'étude, des cellules de l'épithélium trachéal de cobaye maintenues en culture primaire. Le protocole expérimental a recherché la libération éventuelle d'acides sialiques à partir des membranes cellulaires: par dosage HPLC (3) dans le milieu de culture et par marquage des membranes cellulaires à l'aide de lectines couplées à la peroxydase (4). Cette technique a été rendue quantitative par la pratique des cultures en plaques à microtitration.

### 2- MATERIEL ET METHODES

#### 2-1 Cultures.

La mise en culture des cellules a été réalisée selon un protocole déjà publié (5).

#### 2-2 Marquages avec les lectines.

L'élimination des acides sialiques terminaux des sialoglycoconjugués démasque le disaccharide  $\beta$ -D-galactose-N-acétyl galactosamine qui est reconnu spécifiquement par la lectine extraite d'*Arachis hypogaea* (Peanut-agglutinine = PNA). L'utilisation d'une PNA marquée va permettre la quantification de la désialylation du substrat. La PNA peut être couplée soit à la peroxydase (POD) dans une méthode directe, soit à la digoxigénine dans la technique indirecte. Pour ce dernier cas, la PNA est couplée à la digoxigénine (alcaloïde extrait de la digitale) qui est reconnue dans la deuxième étape par des fragments Fab d'IgG de mouton anti-digoxigénine couplés à la POD. D'autre part, les acides sialiques terminaux peuvent être reconnus directement par deux lectines, l'une extraite de *Maackia amurensis* (MAA) spécifique des acides sialiques liés au galactose par une liaison osidique de type  $\alpha$  2-3

et l'autre extraite de *Sambucus nigra* (SNA) spécifique des acides sialiques liés au galactose par une liaison osidique de type  $\alpha$  2-6. Enfin, la lectine extraite de *Galanthus nivalis* (GNA) reconnaît le mannose en position terminale dans les chaînes polysaccharidiques. L'utilisation de ces lectines couplées à la digoxigénine permet leur révélation par les anticorps anti-digoxigénine couplés à la POD. L'activité peroxydasique est révélée par une solution de 3,3' 5,5'-tétraméthylbenzidine (TMB) à 0,4 g/l en tampon citrate/acide citrique 0,1 M, pH 5,5 en présence d'eau oxygénée.

### 3- RESULTATS

#### 3-1 Etude morphologique des cultures témoins.

La croissance progressive dans le temps des cellules après coloration par le May Grünwald Giemsa (MGG) a été étudiée respectivement à J 1, J 3, J 4 et J 5. A partir d'îlots isolés observés à J 1, 2 et J 3, les cellules arrivent à confluence à J 4 et le tapis cellulaire est parfaitement continu à J 5. La coloration par le bleu trypan montre que la viabilité des cellules est toujours excellente (2% de cellules mortes à J 5). Les cellules ne sont donc altérées ni par le traitement à la protéase ni par les conditions de culture.

Comme attendu lorsque les cellules épithéliales sont mises en culture après dissociation à la pronase, l'observation au microscope électronique à balayage montre que la proportion de cellules ciliées est faible (de l'ordre de 5%). Les cellules ciliées observées sont souvent groupées en îlots et possèdent un appareil ciliaire bien développé. L'observation des cellules par les techniques de microscopie électronique à transmission a montré que la monocouche cellulaire présente des jonctions intercellulaires serrées. Ces cultures présentent donc des caractéristiques de cellules épithéliales de bonne qualité. Les cellules n'ont jamais été cultivées au delà de 12 jours.

#### 3-2 Etude morphologique après traitement acide.

L'observation en microscopie à balayage montre que les cils persistent sur les cellules mais qu'ils sont de plus en plus endommagés lorsque le pH diminue. De la même façon, les jonctions intercellulaires sont de plus en plus relâchées.

Le test au bleu trypan démontre que la viabilité des cellules n'est fortement altérée que pour les pH inférieurs à 5. Le tableau 1 donne les pourcentages de cellules mortes observés après incubation des cultures à pH 6, 5, 4, 3 et 2. Afin de certifier que l'incubation des cellules dans des tampons de pH compris entre 7,5 et 5 n'avait effectivement pas d'effet sur la viabilité cellulaire, un test de vitalité plus sensible (MTT) a été réalisé. Il a confirmé les résultats obtenus avec le bleu trypan.

pH	6	5	4	3	2
Cellules vivantes (%)	90	70	50	10	5

**Tableau 1 :** Evaluation de la viabilité des cellules en culture à J5 après traitement acide par la méthode d'exclusion au bleu trypan. (A pH 7,3, la vitalité est de 98%).

### 3-3 Effets de la sialidase de *Vibrio cholerae* sur la glycosylation membranaire des cellules en culture.

#### 3-3-1 Etude par H.P.L.C.

Une gamme réalisée avec de l'acide sialique pur permet d'établir que dans nos conditions expérimentales, le dosage par HPLC révèle une relation linéaire entre l'absorbance, mesurée à 579 nm, et une quantité d'acides sialiques comprise entre 0 et 12 nmoles. Le traitement des cultures par des quantités croissantes de sialidase montre bien une élévation progressive de la quantité d'acides sialiques libérés (Fig.1a, b).

#### 3-3-2 Etude avec les lectines.

##### 3-3-2-1 Influence du temps de culture sur la réactivité avec les lectines.

La réactivité des cellules avec la lectine PNA semble augmenter progressivement dans le temps (Tableau 2), ce qui indiquerait une relative désialylation de la membrane. Par contre, cette augmentation de la fixation de PNA n'est pas associée à la diminution logiquement attendue des lectines MAA et SNA spécifiques de l'acide sialique. L'augmentation de la réactivité avec PNA pourrait donc représenter l'apparition progressive dans le temps de résidus galactose non sialylés. L'évolution de la réactivité avec GNA n'a pas été étudiée dans ce cas. Il apparaît donc que J 5 représente le meilleur délai pour notre étude puisque les cellules sont alors à confluence et que la fixation des différentes lectines est optimale et cohérente.

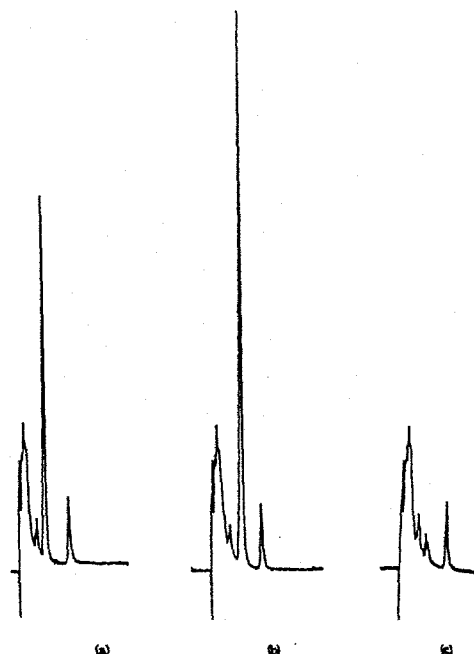
Lectines	Temps de culture (jours)			
	J4	J5	J6	J7
PNA	0,295 ± 0,015	0,450 ± 0,010	0,580 ± 0,010	0,660 ± 0,015
MAA	1,140 ± 0,010	1,145 ± 0,015	1,295 ± 0,010	1,145 ± 0,045
SNA	1,135 ± 0,010	1,090 ± 0,010	1,085 ± 0,020	1,060 ± 0,035

**Tableau 2 :** Modifications dans le temps de la réactivité des cellules épithéliales de trachée de cobaye avec différentes lectines pour des cultures témoins à pH 7,3. Les valeurs représentent les moyennes de 6 mesures.

##### 3-3-2-2 Effet du traitement par la sialidase de *Vibrio cholerae*.

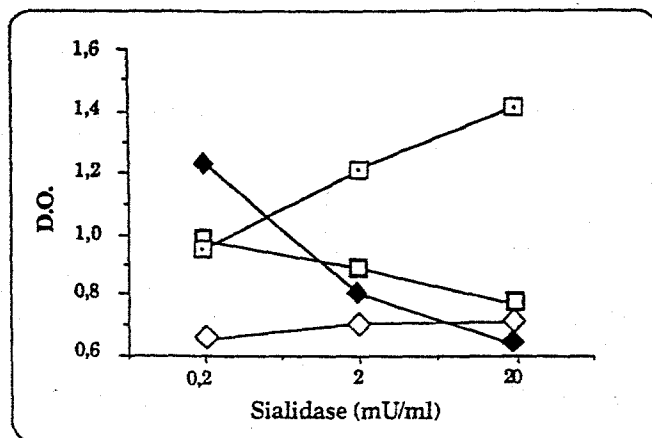
La désialylation des cellules épithéliales en culture réalisée expérimentalement par incubation avec une solution de sialidase de *Vibrio cholerae* résulte en une augmentation de la réactivité avec les lectines PNA et GNA et une diminution de la réactivité avec les lectines SNA et MAA (Fig.2).

L'augmentation de la fixation de PNA et de GNA suggère le démasquage des sucres sous-jacents à l'acide sialique, la fixation plus faible de SNA et de MAA montre la diminution de l'expression membranaire des acides sialiques liés respectivement en 2-6 et 2-3. Ces

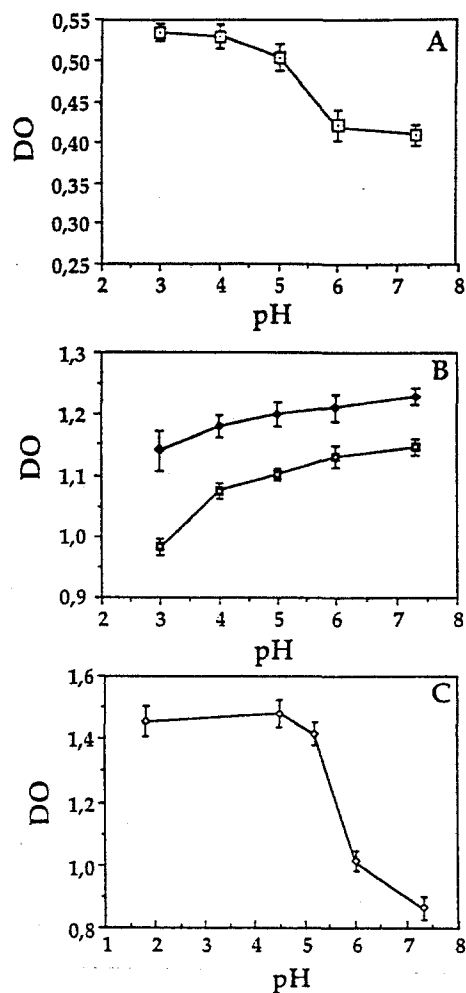


**Figure 1 :** Chromatogrammes des surnageants de cultures de cellules trachéales après traitement :

- a) par une solution de sialidase à 2 mU
- b) par une solution de sialidase à 20 mU
- c) par une solution acide pH 5



**Figure 2 :** Effet du traitement par une sialidase de *Vibrio cholerae* sur la fixation de diverses lectines : PNA (□), MAA (◆), SNA (□) et GNA (◇) sur des cultures cellulaires d'épithélium trachéal de cobaye à J 5. Les valeurs de DO des témoins PBS pH 7,3 sont de 0,330 pour PNA, 1,225 pour MAA, 1,037 pour SNA et 0,702 pour GNA.



**Figure 3 :** Modification de la fixation des lectines (a) :  $\square$  PNA, (b) :  $\blacklozenge$  MAA et  $\square$  SNA, (c)  $\diamond$  GNA sur des cultures à J5 incubées par des tampons de pH différents. Les valeurs des DO témoins sialidase (diluée au 1/500) sont de : 1,450 pour PNA ; 0,540 pour MAA ; 0,930 pour SAN et 1,230 pour GNA. Les DO pour chaque point (moyenne  $\pm$  ESM) ont été calculées sur 6 dosages.

observations démontrent donc que ce modèle expérimental est bien capable de mettre en évidence une désialylation de la membrane cellulaire sur cellules non fixées.

### 3-4 Effets du pH sur la glycosylation membranaire des cellules en culture.

#### 3-4-1 Etude par H.P.L.C.

L'analyse par HPLC des surnageants de culture obtenus après incubation en pH acide (de 6,5 jusqu'à 3) n'a jamais mis en évidence la présence d'acides sialiques libres en quantité significativement différente de celle des témoins provenant de culture incubées dans les conditions normales à pH 7,3 (Fig. 1c).

#### 3-4-2 Etude avec les lectines.

L'incubation préalable des cultures cellulaires dans des tampons à pH acide provoque une modification de la fixation des lectines compatible avec une désialylation relative de la membrane cellulaire (Fig.3 a, b, c). Les différences de fixation des diverses lectines sont cependant beaucoup plus limitées que celles obtenues après incubation avec la sialidase. Il faut noter ici encore que c'est la fixation de la GNA qui paraît la plus sensible pour révéler l'effet du pH sur la glycosylation membranaire.

## 4- DISCUSSION

La préparation de cultures de cellules épithéliales de trachée de cobaye en microplaque après dissociation par la pronase montre que les cellules croissent en monocouche; habituellement, les cellules arrivent à confluence après 5 jours de culture et présentent une inhibition de contact, les cellules restant jointives avec des jonctions serrées intercellulaires. La vitalité est bonne (>95%) jusqu'à 7 jours de culture; la proportion de cellules ciliées est cependant faible (<5%). Ce pourcentage est habituel dans ces conditions de culture; l'utilisation d'une matrice (collagène, matrigel) permettant de conserver une meilleure différenciation des cellules ciliées.

La glycosylation membranaire varie avec le temps de culture de J4 à J7. Ainsi la fixation de la lectine peanut-agglutinine (PNA) extraite d'*Arachis hypogae* augmente. Cette lectine reconnaît spécifiquement les structures galactose- $\beta$ -D-N acétyl galactosamine démasquées par désialylation des structures O-glycosylées. Ceci pourrait provenir d'une expression accrue de galactose non sialylé puisque les fixations des lectines SNA et MAA qui sont respectivement spécifiques des acides sialiques liés en 2-6 et 2-3 restent inchangées dans les mêmes délais. Pour la suite du travail nous nous sommes donc placés à J5 qui semble constituer le meilleur délai.

La technique de culture en microplaque a permis de mettre en évidence des modifications de la sialylation membranaire après traitement par une sialidase d'origine bactérienne (*Vibrio cholerae*). Dans ces conditions, nous avons observé une diminution de la fixation de SNA et de MAA et inversement une augmentation de la fixation des lectines spécifiques du galactose (lectine PNA) et du mannose (lectine GNA). Ces observations étaient

attendues puisque, dans la chaîne polysaccharidique des glycoconjugués, on sait que la sialidase de *Vibrio cholerae* libère les acides sialiques terminaux liés par des liaisons de type 2-3 (reconnues par MAA) et de type 2-6 (reconnues par SNA). Cette libération d'acide sialique rend alors accessibles les sucres immédiatement sous-jacents comme le galactose (reconnu par PNA) ou plus éloignés comme le mannose (reconnu par GNA). La reconnaissance par la lectine GNA montre que les glycoconjugués de la membrane cytoplasmique ne sont pas seulement O-glycosylés mais également en partie N-glycosylés. Les acides sialiques n'étant pas directement liés au mannose, l'augmentation de fixation de GNA après désialylation pourrait s'expliquer par la diminution de l'encombrement des acides sialiques, soit simplement par un effet stérique, soit en raison de leur forte charge électro négative.

Après incubation en tampon de pH acide, la viabilité mesurée par le test au bleu trypan reste supérieure à 70% jusqu'à pH 5, ce résultat a été confirmé par le test au MTT. L'observation en microscopie électronique montre que la ciliature persiste jusqu'à pH 2, cependant, les cellules sont alors très altérées avec une dissociation de la cohésion intercellulaire. L'effet des tampons de pH acide est révélé par les différences de réactivité avec les lectines. La réactivité est fortement perturbée dès pH 6 alors même que nous avons vu précédemment qu'il n'y avait pas de libération d'acides sialiques. Les différences de fixation des lectines doivent en fait correspondre non pas à une modification quantitative des sucres exprimés sur la membrane cytoplasmique, mais à une différence qualitative, l'acidité ambiante provoquant des modifications dans la configuration spatiale des molécules de sucres qui réagissent alors différemment avec leur lectine spécifique. Nous pouvons donc conclure que ce système constitue un excellent révélateur des perturbations induites sur les sialoglycoconjugués membranaires par des milieux acides.

Les résultats obtenus au cours de cette étude confirment donc que les sucres exprimés à la surface cellulaire constituent une cible privilégiée pour des agents environnementaux et que les altérations biochimiques qui en découlent peuvent être significatives pour l'état de santé de l'organisme ainsi exposé.

## Références

- 1- Weir, D.M. (1989) Carbohydrates as recognition molecules in infection and immunity. *FEMS Microbiol; Immunol.* ; **47** : 331-340.
- 2- Corfiel, A.P., Lambré, C.R., Michalski, J.C., and Schauer, R. (1991) Rôles des acides sialiques et des sialidases dans les processus de la reconnaissance moléculaire. *Conférences INSERM Philippe Laudat* ; pp. 111-175.
- 3- Powell, L.D. and Hart, G.W. (1986) Quantification of picomole levels of N-acetyl- and N-Glycolylneuraminic acids by HPLC-adaptation of the thiobarbituric acid assay. *Anal. Biochem.*; **157** : 179-185.
- 4- Rogerieux, F., Belaise, M., Terzidis-Trabelsi, H., Greffard, A., Pilatte, Y. and Lambré, C.R. (1993) Determination of the sialic acid linkage specificity of sialidases using lectins in a solid phase assay. *Anal. Biochem.*; **211** : 200-204.
- 5- Nahori, M.A., Prevost, M.C. and Gounon, P (1991) Guinea pig tracheal epithelial cells in primary culture : morphological and metabolic characterization. *J. Lipid Mediators* ; **3** : 101-112.